

細胞間相互作用のシステムの理解

●上田 泰己 ◆鵜飼 英樹

独立行政法人理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター

<研究の目的と進め方>

動的で複雑な生命現象を理解することは一般的に難しく、その解明のための手法・研究戦略は発展途上の段階である。特に多細胞生物を多細胞生物たらしめている細胞間相互作用を担う動的で複雑なシステムを体系的・効率的に同定・解析していく手法・研究戦略については、まだ確立されているとは言えない。我々は、動的で複雑な細胞間相互作用の一つである哺乳類の概日時計における細胞間相互作用をモデル系とし、インシリコ・インビボにおいて細胞間相互作用の遺伝子ネットワークを設計・再構成することで、予測されるメカニズムの再構成的証明を行う。これらの解析を通して細胞間相互作用の設計原理を理解するとともに、細胞分化など細胞間相互作用を要とする他の生命現象にも応用可能な研究戦略を提供する。

<2007年度の研究の当初計画>

[準備状況]

これまでに、半減期の短い不安定化ルシフェラーゼ (dLuc) を開発し、概日時計に制御されるプロモーター下で発現させることで遺伝子の概日発現振動をリアルタイムにモニター可能な系を構築済みである。このレポーター系を用いて、細胞間同調に必要な条件をハイスループットに検証するための準備として、288サンプルの細胞集団の生物発光を同時に測定可能な装置を3台構築済みである。さらに、細胞間同調をより精緻に観察・測定するためには、概日振動するレポーター遺伝子の発光を一細胞レベルでモニターすることが必要である。そこで高感度冷却 CCD カメラ付顕微鏡システムを用いて、細胞間同調を一細胞レベルで観察可能な実験系の構築を行った。測定条件の詳細な検討を積み重ね、一週間安定して一細胞レベルでの発光の概日振動を自動リアルタイムモニタリングすることがすでに可能となっている。

[培養細胞の概日振動非同期化手法の確立]

これまでに開発してきた技術を用い、概日時計の細胞間同調を観測するためには、概日振動の位相が異なる細胞間の相互作用を観察することが必要である。しかしその一方で、培養細胞の概日振動の位相は、cAMP 濃度の上昇を誘導する薬剤の添加の他にも、培養液の交換（栄養状態の変化）や温度の変化等、培養環境のわずかな変化によっても速やかに同期してしまい、非同期状態を自在に実験的に誘導することは非常に困難である。培養細胞を培養器内で一週間以上放置する事によって、ほぼ非同期化した細胞集団を得ることは可能であるが、その様な手法では健全な細胞を用いた解析とは言い難い。我々は2006年度までに、培養細胞集団中の特定の細胞における概日振動の位相を外からコントロールする手法の開発を行っていた。具体的な手法としては、細胞培養環境に大きな変化を与えずに細胞の状態を制御可能な因子の候

補として「光刺激」の利用を検討し、光受容体を培養細胞に発現させ、培養液の温度に影響を与えない程度の光を照射することで光受容体依存的に培養細胞の概日振動の位相をシフトさせることが可能な系の構築を行った。2007年度はこの系を用いて照射条件を詳細に検討することにより、同期振動している培養細胞集団を任意に非同期化させることが可能な実験系の構築を目指した。この手法と、一細胞発光モニタリングシステムを用いることで、細胞間相互作用の詳細な観察が可能な状況を整備する。

[細胞間同調機構再構成のための基礎データの取得]

細胞間同調をイン・シリコにおいて再構成するとともに、概日振動は示すが同調能が無い実際の培養細胞に、細胞間同調に関わる事が現在推定されている受容体を発現させ、外部から受容体に対するリガンドを添加し、細胞の概日振動の位相に与える影響を詳細に解析する。

[SCNのスライス培養系を用いた検証実験系の開発]

同調機構の存在が報告されている組織での検証実験を行うための基礎技術はまだ整備されていない。そこで、時計の中核であり、同調機構の存在が報告されている組織である SCN のスライス培養系等を対象とした一細胞発光ダイナミクスのリアルタイム測定系、および摂動実験系の開発を進める。

<2007年度の成果>

[培養細胞の概日振動非同期化手法の確立]

概日振動している光受容体導入細胞に、24時間にわたって様々なタイミング・長さで光刺激を与え、その影響を詳細に解析した。その結果、ある特定のタイミングで光刺激を与えることで、同期振動している細胞集団を、個々の細胞の振動は維持したまま完全に非同期化した細胞集団へと誘導する事が可能になった。これによって、細胞間同調を観測するための基礎技術が確立された。

この成果を基に、30年以上もの間未解決であった「シンギュラリティー現象」と呼ばれる概日時計が停止する現象が、時計細胞同士の脱同調による事を実験及び数理モデルを用いて立証し、論文として発表した。(Ukai et al. *Nat. Cell Biol.* 2007)

[細胞間同調機構再構成のための基礎データの取得]

マウス脳より RNA を抽出し、細胞間同調に関わると推定されている受容体の cDNA をクローニングし、遺伝子発現コンストラクトを作成した。現在これを用いて培養細胞に受容体を発現させ、外部からリガンドを添加することによって細胞の概日振動の位相に与える影響を測定している。

[SCNのスライス培養系を用いた検証実験系の開発]

概日時計の振動を生物発光により計測可能な *Per2-Luc* ノックインマウス由来の SCN を用いてスライス培養を行い、一細胞発光測定システムにて同調振動の観察を試みた。用いる緩衝液などの切片作成条件や、発光測定条件を詳細に検証した結果、SCN 組織内での同調した概日振動の計測が可能となった。また、組織における摂動実験系の確立のために、組織特異的に光受容体を発現可能なコンディショナルトランスジェニックマウスの作成にとりかかった。

<国内外での成果の位置づけ>

細胞間相互作用の再構成研究は世界的にみても未開拓の分野である。既に一細胞レベルでの発光の長期連続モニタリングを行える系も確立しており、この技術を保有する研究室は世界的に見ても少ない。また、概日時計の同調を観測するためには、異なる位相をもった時計細胞間の相互作用を観察することが必要であり、我々は光刺激を用いて培養細胞の概日振動の位相を外からリアルタイムにコントロールできるシステムを構築し、同期振動している培養細胞を非同期化させることに成功した。この手法は、本課題の遂行の過程で世界で初めて確立した独自技術であり、我々はこの技術と一細胞発光モニターシステムとを組み合わせる用いることが可能であるため、細胞間同調機構の再構成研究を効率よく進めるうえで優位な状況にある。

光刺激を用いて概日振動を任意に非同期化させる手法を用いて、概日時計のシンギュラリティー現象を解析した成果は、査読の厳しい国際誌に掲載され、研究代表者の上田は時間生物学会学術奨励賞を授与された。これらは、本成果が国内外で高く評価された事を示している。

光刺激は、細胞の培養環境に大きな変化を与えずに刺激可能であるとともに、時間的・空間的に分解能が高く定量的な刺激方法であり、今回の光を用いた刺激方法の確立は、今後の定量生物学的解析の発展において重要な役割を果たすと期待される。この様に、本課題では動的で複雑な細胞間相互作用の一つである哺乳類の概日時計における細胞間相互作用をモデル系として研究戦略を構築・適用しているが、本戦略の基盤技術は、他の系（例えば分化のような細胞間相互作用が極めて重要な生命現象）にも応用可能であり、本成果は国内外の生命科学研究に多大な波及効果を与えらると思われる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

特に無し。

<今後の課題>

概日時計の細胞間同調を観察するための基盤技術はほぼ整備されてきた。今後は、実際に細胞間同調能の無い培養細胞への同調システムの再構成が課題となる。

同調機構の存在が報告されている組織での検証実験を行うための基礎技術はまだ充分には整備されていない。今後は SCN のスライス培養系等を対象とした摂動実験系の開発にも取り組む。

<成果公表リスト>

1) 論文／プロシーディング

1. 08012517349

Hideki Ukai, Tetsuya J. Kobayashi Mamoru Nagano, Koh-hei

Masumoto Mitsugu Sujino, Takao Kondo, Kazuhiro Yagita, Yasufumi Shigeyoshi and Hiroki R. Ueda* "Melanopsin-dependent photo-perturbation reveals desynchronization underlying the singularity of mammalian circadian clocks", *Nature Cell Biology*, 9, 1327 - 1334 (2007).

2. 0606051548

Trey K Sato, Rikuhiko G Yamada, Hideki Ukai, Julie E Baggs, Loren J Miraglia, Tetsuya J Kobayashi, David K Welsh, Steve A Kay, Hiroki R Ueda* & John B Hogenesch, "Feedback repression is required for mammalian circadian clock function" *Nature Genetics* 38, 312-319 (2006).

2) データベース／ソフトウェア

特に無し。